

桑葚的抗氧化和抗疲劳活性研究

滕亚然¹ 赵乐凤¹ 张喆¹ 孙乐¹ 刘淑莹^{1,2} 吴巍^{1*}

(1. 长春中医药大学, 吉林省人参科学研究院, 长春 130117;

2. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春质谱中心, 长春 130022)

摘要:目的 探讨桑葚对小鼠抗氧化抗疲劳活性研究。方法 ICR 雄性小鼠, 随机分为桑葚水提物高、中、低剂量组和空白对照组, 每天按体重灌胃给药三周后测定指标, 采用游泳法观察药物的抗疲劳作用。结果 高剂量组明显增加了小鼠体内 SOD 和 CAT 活力, 降低 MDA、BUN 和 Lactic Acid LD 水平, 低、中、高剂量组均使肝糖原水平显著升高且负重游泳时间明显加长。结论 桑葚水提物具有较好的抗氧化和抗疲劳作用。

关键词:桑葚; 抗氧化; 抗疲劳; 活性研究

Research on anti-oxidation and anti-fatigue activity of Mori Fructus

TENG Ya-ran¹, ZHAO Le-feng¹, ZHANG Zhe¹, SUN Le¹, LIU Shu-ying^{1,2}, WU Wei¹

(1. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Jilin Changchun 130117, China;

2. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Jilin Changchun 130022, China)

Abstract: Objective To investigate the anti-oxidation and anti-fatigue activities of Mori Fructus. Methods ICR male mice were divided randomly into high, medium, low dose group and blank group, gavage according to the weight per day for 3 weeks and measured values. Experiments of loaded swimming were done to assess anti-fatigue effects of drugs. Results The high dose and middle dose group of Mori Fructus aqueous extract could significantly increase activities of SOD, CAT, and decrease the content of MDA, BUN, and Lactic Acid LD. The low, middle, high dose group could significantly increase activities of mice liver glycogen and the time of loaded swimming was longer. Conclusion Mori Fructus aqueous extract has anti-oxidant and anti-fatigue effects.

Keywords: Mori Fructus; antioxidation; anti-fatigue; activity study

桑葚(*Mori Fructus*)为桑科植物桑(*Morus alba* L.)的干燥果穗^[1]。桑葚不但含有丰富的营养成分,还可以药用,近年来桑葚已成为一种新型的果品加工类型,并且其独特的保健作用已经引起广泛的研究^[2,3]。其中含有钙铁等矿物质以及维生素、微量元素等人体必需物质,其中生物碱、多酚、黄酮类等为主要有效成分^[4]。黄酮类和多酚类以及色素类物质均可通过抑制或清除自由基来防止机体的氧化损伤。杨立坤^[5]等研究黑桑葚水也能显著提升高龄小鼠的 SOD 和 GSH-Px 的活力。施洪飞^[6]等以桑葚水提液给高龄小鼠灌胃后测定与延缓衰老的生化指标。结果表明黑桑葚提取液能使超氧化物歧化酶(SOD)活性显著增强($p < 0.05$ 或 0.01),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)活性显著提高($p < 0.01$),过氧化脂质(LPO)含量明显降低,证明黑桑葚提取液具有较明显的抗氧化和抗衰老

作用。本文采用游泳法观察桑葚提取物的抗疲劳作用,并通过考察抗氧化活性和抗疲劳生化指标超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)和过氧化氢酶(CAT)值以及小鼠肝糖原、血尿素氮(BUN)和全血乳酸(Lactic Acid LD)值,综合系统地评价桑葚的抗氧化和抗疲劳活性。

1 仪器与材料

DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥器(上海一恒科学仪器有限公司);电热恒温水浴锅(金坛市江南仪器厂);TDZ5WS 多管架自动平衡离心机(长沙湘仪离心仪器有限公司);酶标仪 Multiskan MK3(美国 Thermo 公司);

超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒;尿素试剂盒、糖原试剂盒、血乳酸测定试剂盒,均购于南京建成生物工程

基金项目:吉林省科技厅人参化学与药理重点实验室探索项目,项目编号:20160101334JC。

作者简介:滕亚然,女,在读硕士,研究方向:中药有效成分分析。

* 通讯作者:吴巍,女,研究员,博士,主要从事中药化学成分、药效物质基础研究。

研究所;生理盐水购于四平巨能药业有限公司;桑葚购于安徽亳州。

雄性 ICR 小鼠 80 只,体质量为 (20 ± 2) g,由长春生物制品研究所有限责任公司提供[SCXK-(吉 2011-0003)]。

2 方法

ICR 雄性小鼠,在实验条件下适应 5d 后,随机分为 4 组,分别为桑葚提取物高、中、低剂量组 $(5.625 \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}, 0.5625 \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}, 0.1875 \text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$ 空白对照组 (ig 等体积生理盐水),每天按体重 ig 给药 $(0.2 \text{ml}/20 \text{gBW})$ 连续三周。

2.1 负重游泳实验

末次灌胃给药 2h 后,采取负重 (体重的 5%) 在 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 水中游泳,用 $60 \text{cm} \times 40 \text{cm} \times 50 \text{cm}$ 的水槽多个同时使用,水深 $30 \pm 2 \text{cm}$ 。小鼠尾根部 $1/3-2/3$ 处负荷铅皮,用秒表记录小鼠从游泳开始至死亡的时间。

2.2 小鼠血清 SOD,MDA 和 CAT 值的测定

灌胃处理 25d 后,每组各选取 10 只小鼠,于末次给药后 30min,置于 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 水中游泳,用 $60 \text{cm} \times 40 \text{cm} \times 50 \text{cm}$ 的水槽多个同时使用,水深 $30 \pm 2 \text{cm}$ 。小鼠游泳 30min 后摘取眼球取血, $4000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5min 后取上层血清,按照 SOD、MDA 和 CAT 试剂盒说明书操作处理样品并用酶标仪测定血清 SOD 活力及 MDA 含量,CAT 活力。

2.3 小鼠肝糖原的测定

灌胃处理 25d 后,每组各选取 10 只小鼠,末次灌胃给药 30min 后,摘取眼球取血后立即处死,解剖取肝脏,生理盐水漂洗后滤纸吸干,称重,测定肝糖原。

2.4 小鼠血尿素氮 (BUN) 和全血乳酸 (Lactic Acid LD) 的测定

小鼠连续灌胃处理 25d 后,每组各选取 10 只小鼠,于末次灌胃给药 30min 后,置于 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 水中游泳,用 $60 \text{cm} \times 40 \text{cm} \times 50 \text{cm}$ 的水槽多个同时使用,水深 $30 \pm 2 \text{cm}$ 。小鼠自由游泳 30min 后摘眼球采血,取血清用于血清尿素氮的测定,取全血用于全血乳酸的测定。

2.5 统计学方法

实验数据利用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理分析,结果以“均值 \pm 标准差” ($\pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 比较数据,方差齐时用 LSD 检验,方差不齐时用秩和检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果与讨论

3.1 桑葚水提物对负重小鼠游泳时间的影响

表 1 桑葚水提物对负重小鼠游泳时间的影响

组别	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	动物数 (只)	游泳时间 (min)	游泳时间增加率 (%)
对照组	0	10	4.51 ± 1.01	—
低剂量组	0.1875	10	$6.83 \pm 2.52^*$	51.44
中剂量组	0.5625	10	$7.65 \pm 3.20^{**}$	69.62
高剂量组	5.625	10	$7.87 \pm 3.18^{**}$	74.50

与对照组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$

由表 1 可见,给予不同计量的桑葚水提物 25d 后小鼠的负重游泳时间均有所增加,中、高剂量组小鼠负重游泳时间相对较长,与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$),低剂量组小鼠负重游泳时间次之,与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

3.2 桑葚水提物对小鼠血清 SOD,MDA 和 CAT 活力的影响

表 2 桑葚水提物对小鼠血清 SOD,MDA 和 CAT 活力的影响

组别	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	SOD 活力 ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MDA 含量 ($\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	CAT 活力 ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照组	—	259.3 ± 53.6	10.2 ± 0.5	3.98 ± 0.08
低剂量	0.1875	$319.5 \pm 26.8^*$	9.7 ± 0.56	4.19 ± 0.17
中剂量	0.5625	$360.2 \pm 54.3^{**}$	$8.8 \pm 0.39^*$	4.06 ± 0.23
高剂量	5.625	$369.9 \pm 34.7^{**}$	$8.9 \pm 0.21^*$	$4.45 \pm 0.34^*$

与对照组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$

由表 2 可知桑葚水提产物低剂量组与空白对照组比较,SOD 活力升高有显著性差异 ($p < 0.05$)。桑葚水提产物中剂量组和高剂量组与空白对照组比较 SOD 活力明显升高有及显著性差异 ($p < 0.01$)。桑葚水提产物低剂量组与空白对照组比较 MDA 含量虽有所降低但差异并不显著,而中剂量组和高剂量组与空白对照组比较 MDA 含量明显降低有显著性差异 ($p < 0.05$)。桑葚水提产物低剂量组和中剂量组与空白对照组比较 CAT 活力有所升高但无显著性差异,而高剂量组与空白对照组比较 CAT 活力明显升高有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3.3 桑葚水提物对小鼠肝糖原的影响

表 3 桑葚水提物小鼠肝糖原的影响

组别	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	动物数 (只)	肝糖原 (mg/g)
对照组	0	10	16.79 ± 3.82
低剂量组	0.1875	10	$28.32 \pm 7.27^{**}$
中剂量组	0.5625	10	$30.36 \pm 6.86^{**}$
高剂量组	5.625	10	$28.08 \pm 8.01^{**}$

与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

由表3可知, 桑葚水提物低、中、高剂量组的肝糖原含量与对照组比较肝糖原含量均有增高而且存在及显著性差异($P<0.01$)。

3.4 桑葚水提物对小鼠血清尿素氮和全血乳酸的影响

表4 桑葚水提物对小鼠血清尿素氮和全血乳酸的影响

组别	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	动物数(只)	血清尿素氮 (mmol/L)	全血乳酸 (mmol/L)
对照组	0	10	5.33 ± 0.85	20.93 ± 2.84
低剂量组	0.1875	10	5.23 ± 0.79	18.68 ± 2.88
中剂量组	0.5625	10	$4.34 \pm 0.75^*$	$15.66 \pm 1.54^*$
高剂量组	5.625	10	$4.38 \pm 0.63^*$	$16.48 \pm 2.61^*$

与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

由表4可知桑葚水提物低剂量组与空白对照组比较血清尿素氮含量并无明显差异无统计学意义, 而中剂量组和高剂量组与空白对照组比较血清尿素氮含量明显低于空白对照组有显著性差异($P<0.05$)。低剂量组与空白对照组比较全血乳酸含量虽有所降低但差异并不显著, 而中剂量和高剂量组与空白对照组比较全血乳酸含量明显降低有统计学意义($P<0.05$)。

4 讨论

MDA 是一种脂质过氧化物, 测定 MDA 的含量能够反映出细胞受损的程度。SOD、CAT 均为重要的抗氧化酶, 可消除机体内有害的物质, 能够延缓衰老^[7-9]。疲劳是一种主观的不适应的感觉, 最直接的表现是浑身无力, 而力竭游泳时间是可以反映运动耐力和体力的重要指标^[10]。血清尿素氮是肾功能的一个重要指标, 机体在不能得到充分的能量时就会出现其含量增高的物质, 机体对负荷适应能力越差, 血尿素氮的增加就越明显^[11]。肝糖原含量能直接反映机体糖原代谢情况, 肝糖原储备量将有助于增强耐力以及劳动力, 在机体剧烈运动时, 肌糖原转变成为葡萄糖供给能力, 实验中以肝糖原的含量来反映运动对糖元的消耗情况^[12]。乳酸积累越多, 疲劳程度就越严重, 乳酸积累的程度取决于乳酸产生和清除的速度。若乳酸清除速度大于产生速度则机体可延缓疲劳甚至消除疲劳^[13,14]。负重游泳时间可以直接的体现出小鼠运动抗疲劳的效果从表1可以看出桑葚低、中、高剂量组负重游泳时间与空白对照组比较均有显著影响, 说明桑葚水提物提高了小鼠的运动能力。通过实验结果显示与空白对照组比较桑葚水提物中、高剂量组对 SOD, MDA, CAT 三个抗氧化指标有显著影响。通过使小鼠负重游泳造成氧化应激, 而实验表明桑葚水提物中、高剂量组对负重游泳引起的氧化应激有保护作用, 明显增加了体内 SOD 活力和 CAT 活力, 同时降低了 MDA 水平, 达到抗氧化作用。通过表3的结果显示桑葚水提物的低、中、高剂量均使肝糖原水平显著升高($P<0.01$), 结果

表明, 桑葚水提物可维持肝糖原含量的高水平, 提高小鼠的运动耐受能力。通过表4可以看出桑葚水提物的中剂量组和高剂量组与空白对照组比较均能显著降低小鼠的血清尿素氮水平和血乳酸水平($P<0.05$), 显示桑葚水提物能提高小鼠的运动耐受能力, 快速缓解运动后的乳酸堆积的现象, 从而实现延缓疲劳的功效。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 281.
- [2] 李银, 滕永慧, 陈艺红, 等. 桑椹的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 6(20): 422.
- [3] Sezai E, Emine O. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits [J]. Food Chemistry, 2006, 103 (2007): 1380.
- [4] 张文娜, 姚清国, 俞龙泉, 等. 桑葚化学成分及药理作用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39 (14): 8371, 8375.
- [5] 杨立坤, 施洪飞, 陆广念, 等. 黑桑椹对小鼠 SOD 等活力的影响[J]. 河南中医药学刊, 1999, 14(5): 23.
- [6] WANG J, LISS, FANYYY, et al. Anti-fatigue activity of the water-soluble polysaccharides isolated from *Panax ginseng* CA Meyer [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 130(2): 421~423.
- [7] Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, et al. Free radical induced damage to DNA: Mechanisms and measurement [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2002, 32(11): 1102~1115.
- [8] Re R, Pellegrin IN, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radic Biol Med, 1999, 26 (9 / 10): 1231~1237.
- [9] 施洪飞, 项平, 杨立琨, 等. 鸭血糯黑桑葚抗氧化延缓衰老保健功效研究[J]. 扬州大学学报, 2000, 3(2): 34.
- [10] 尹晓雯, 王莉. 枸杞子对小鼠抗缺氧抗疲劳能力的影响[J]. 农业科学研究, 2013, 29(10): 2378.
- [11] 杨薛康, 海春旭, 梁欣, 等. 枸杞提取物的抗氧化作用[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(6): 518.
- [12] 杨建雄, 王丽娟, 田京伟. 槐米提取液对小鼠抗氧化能力的影响[J]. 陕西师范大学学报, 2002, 30(2): 87.
- [13] 李冰, 王静凤, 傅佳, 等. 刺参对运动小鼠抗疲劳作用的研究[J]. 营养学报, 1999, 21(3): 310.
- [14] 王嵘, 鄢行辉. 复方牛磺酸肌醇口服液抗小鼠体力疲劳的实验研究[J]. 中军事体育学报, 2015, 34(2): 102.
- [15] 赵岩, 秒志岩, 蔡恩博, 等. 人参茸芝胶囊对小鼠抗疲劳作用的实验研究[J]. 卫时珍国医国药, 2014, 25 (11): 2604.